DOI:10.13523/j.cb.20170707

人巨细胞病毒抗原表位的重组表达及免疫原性分析

王　蒙[1]　孙文辉[1]　姬芳玲[1]　蒲中机[1]　李寅生[2*]　包永明[1*]
(1 大连理工大学生命科学与技术学院　大连　116024　2 大连市药品检验所　大连　116029)

摘要　目的:用大肠杆菌表达系统表达人巨细胞病毒(HCMV)pp65 蛋白和 gB 蛋白的优势抗原表位基因,制成 HCMV 亚单位疫苗,探究其在 Balb/c 小鼠体内的体液免疫和细胞免疫活性。方法:选取 pp65 蛋白的 490 ~ 508aa 和 gB 蛋白的 607 ~ 621aa 的基因片段,经 PCR 扩增目的片段,连接表达载体 pET-32a(+),转化 BL21(DE3)plys 菌株,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)分析蛋白质表达,金属螯合亲和镍柱法纯化目的蛋白。重组蛋白免疫 Balb/c 小鼠,Western blotting 法和间接 ELISA 法检测重组蛋白的体液免疫活性;通过流式细胞仪和双抗夹心 ELISA 法检测重组蛋白的细胞免疫活性。结果:获得分子质量约为 22kDa 的融合蛋白,Western blotting 检测显示抗体有特异性,间接 ELISA 法检测其效价为 1∶102 400。与对照组相比,实验组小鼠外周血中 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞的数量,以及 IFN-γ、IL-2、IL-12 的含量有显著提高($P<0.01$)。结论:制备的具有免疫优势抗原表位的重组蛋白能诱导小鼠产生较强的体液免疫和细胞免疫反应。

关键词　人巨细胞病毒　pp65 蛋白　gB 蛋白　体液免疫　细胞免疫
中图分类号　Q816

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)属于疱疹病毒科的双链 DNA 病毒,病毒颗粒由外到内主要由包膜、被膜、核衣壳组成[1]。HCMV 在人体内的感染以潜伏感染为主。当人体免疫功能不成熟或缺陷时,潜伏病毒重新激活、原发性 HCMV 感染或新 HCMV 毒株的感染都可引起病毒大量增殖,导致损伤和疾病[2-4]。研究发现并证实,HCMV 参与多种疾病的发生,如单核细胞增多症、CMV 综合征、胃肠疾病、肺炎、肝炎、动脉粥样硬化病等;HCMV 还会引起先天性的感染,导致胎儿宫内发育迟缓,脾脏肿大,血小板减少,脉络膜视网膜炎,肝炎[5-8]等先天性疾病。因此,HCMV 也是影响优生优育的重要致病因子之一。

机体受 HCMV 原发感染后,会建立起长期的免疫机制。由于 HCMV 属于胞内感染,只有体液免疫和细胞免疫的共同作用才能彻底有效的清除病毒。机体对 HCMV 的体液免疫反应是由位于病毒颗粒外层的糖蛋白主导激发的。包膜糖蛋白 B(glycoprotein B,gB)是研究较多的糖蛋白,它能激发主要的中和反应,是中和抗体和保护性抗体的重要靶标[9-11]。而外被磷蛋白 65 (phosphoprotein65,pp65)是可诱导 $CD8^+$ CTL 反应的最具有免疫原性的病毒抗原,在细胞免疫中发挥重要的作用[12]。

到目前为止,仍没有 HCMV 疫苗可以获准上市。近年来,国内外学者对于 HCMV 疫苗的研制已取得一定进展,如 HCMV pp65 蛋白疫苗、gB 蛋白疫苗、DNA 疫苗等[13-17],通过实验证明可以诱导机体的体液免疫或细胞免疫反应。能同时引起机体体液免疫和细胞免疫的亚单位疫苗却鲜有报道。一方面,重组表达一种蛋白质同时实现体液免疫和细胞免疫尚需技术突破;另一方面,分别重组表达 pp65 和 gB 部分蛋白质,进行复合制备抗原也需要大量的优化工作。根据文献及生物信息学方法分析,pp65 蛋白的 490 ~ 508 位氨基酸序列和 gB 蛋白的 607 ~ 621 位氨基酸序列具有较强的免疫原性,可认定为免疫优势表位。因此,本研究选取 $pp65_{490\sim508}$ 和 $gB_{607\sim621}$ 基因,表达成融合蛋白,制备一种

收稿日期:2017-01-23　　修回日期:2017-04-03
* 通讯作者,电子信箱:biosci@dlut.edu.cn;huhuhu19860308@126.com

同时含有 T 细胞和 B 细胞的优势抗原表位的 HCMV 疫苗,能同时诱导体液免疫和细胞免疫反应,可以有效防治 HCMV 感染,为今后相关疫苗研究及 HCMV 相关疾病的防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

E. coli DH5α 和 *E. coli* BL21(DE3)plys 菌株均为本实验室保存。pET-32a 载体用于蛋白质表达,为本实验室保存。质粒提取、DNA 回收试剂盒购自 Omega 公司,*Bam*HI 和 *Hind*Ⅲ限制性内切核酸酶、*Taq* 酶、DNA 连接酶、DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司,引物由华大基因有限公司合成。IFN-γ 定量检测试剂盒购自美国 R&D 公司(进口分装),IL-2、IL-12 定量检测试剂盒购自上海朗顿生物科技有限公司。人 HCMV 阳性血清由辽阳市第三人民医院检验科收集,二抗为辣根过氧化为酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 抗体和羊抗人 IgG 抗体,购自武汉三鹰生物科技有限公司。Balb/c 小鼠由大连医科大学动物研究中心提供。

1.2 方 法

1.2.1 $pp65_{490\sim508}$-GGGGS-$gB_{607\sim621}$ 基因的克隆及重组质粒的构建 基于 Genbank 中 HCMV AD169 株 *pp65* 基因序列和 *gB* 基因序列,设计选取 pp65 蛋白 490 ~ 508aa 和 gB 蛋白的 607 ~ 621aa 的基因片段,两者之间加入 GGGGS 柔链区,人工合成编码基因;以合成编码基因序列作为模板,设计引物 P1 (5′-GACACGGATCCGGCATCCTGGCCCGCAAC)、P2 (5′-GTGTCAAGCTTT CACCCGGCGATGAAGAT),酶切位点为 *Bam*HI 和 *Hind*Ⅲ。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5min;94℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min,30 个循环;72℃ 延伸 10min。经扩增后的目的基因和 pET-32a 载体用 *Bam*HI 和 *Hind*Ⅲ双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳及 DNA 回收纯化后,用 T4 DNA 连接酶 16℃ 过夜连接,将连接产物转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞。提取质粒进行双酶切验证,并送至华大基因有限公司测序,获得阳性克隆。再将重组质粒转化 BL21(DE3)plys 感受态细胞,提取质粒并测序,用 BLAST 进行序列比较及分析。

1.2.2 目的蛋白的表达及纯化 挑取阳性菌落接种于 5ml LB 培养液中,37℃ 培养 12h 后,以 1∶100 转接于新鲜的 LB 培养液中,37℃ 培养至 OD_{600} 约为 0.6 时,加入终浓度为 1mmol /L 的异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG),25℃ 培养 8h,诱导蛋白质的表达。

离心收集菌体,加入含有 20mmol/L 磷酸钠、0.5mol/L NaCl、20mmol/L 咪唑、pH7.4 的磷酸钠缓冲液重悬,冰上超声破碎 5min。将匀浆物在 4℃ 下,12 000r/min,离心 15min。取上清进行镍离子亲和层析柱(1ml HisTrap excel, GE Healthcare, 美国),用 AKTA explorer 蛋白质纯化系统(GE Healthcare, 美国)纯化蛋白质,用含有 20mmol/L 磷酸钠、0.5mol/L NaCl、500mmol/L 咪唑、pH7.4 的洗脱缓冲液洗脱。SDS-PAGE 法检测蛋白质纯度,BCA 法测定蛋白质浓度。

1.2.3 动物免疫 取 6 ~ 8 周龄的 Balb/c 雌性小鼠 16 只,随机分成两组,分别为实验组和生理盐水对照组,每组 8 只。将纯化后的重组蛋白与弗式完全佐剂乳化,腹腔注射,100μg/只,免疫实验组小鼠,2 周后将重组蛋白与弗式不完全佐剂乳化,以同样的方式和剂量再次免疫,1 周后进行加强免疫,共免疫 3 次。同时,以同样的方式和剂量用生理盐水与佐剂混合注射对照组小鼠。于末次免疫一周后分离血清,-20℃ 分装保存。

1.2.4 Western blotting 法检测抗血清的特异性 将重组蛋白进行 SDS-PAGE,电转至 PVDF 膜,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温下封闭 2h;分别加入 1∶1 000 稀释的小鼠阳性血清、阴性血清,4℃ 过夜孵育,TBST 洗膜;加入 1∶5 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠的 IgG,室温下孵育 1h,TBST 洗膜;加入 ECL 试剂后,显色曝光。同时设置一抗为人 HCMV 阳性血清,二抗为 HRP 标记的羊抗人 IgG 作为阳性对照。

1.2.5 间接 ELISA 法检测免疫后小鼠抗血清效价 纯化后蛋白质包被酶标板,100μl/孔,4℃ 过夜孵育,洗剂;用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 缓冲液封闭 2h,洗剂;加入进行一系列梯度稀释(1∶400 ~ 1∶204 800)的阴性血清、阳性血清,37℃ 孵育 1h,洗剂;加入 1∶5 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠的 IgG,37℃ 孵育 1h;洗净甩干后加入 TMB 显色液,避光反应 15min,加入 2mol/L 的 H_2SO_4 终止液。测定阴性血清、阳性血清的 OD_{450nm} 值,以 P/N≥2.1判定为阳性,P/N≥2.1 的最大稀释度作为被检血清的抗体效价。

1.2.6 双抗夹心 ELISA 法检测抗原 取一系列梯度稀释(1∶100 ~ 1∶12 800)的小鼠阳性血清、阴性血清包被酶标板,100μl/孔,4℃ 过夜孵育,洗剂;用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 缓冲液封闭 2h,洗剂;加入重组蛋白,37℃ 孵育 1h,洗剂;加入 1∶100 稀释的人 HCMV 阳性血清,37℃ 孵育 1h,洗剂;加入 1∶5 000 稀释的 HRP 标记的羊

抗人的 IgG,37℃孵育 1h;洗净甩干后加入 TMB 显色液,避光反应 15min,加入 2mol/L 的 H_2SO_4 终止液。测定阴性血清、阳性血清的 OD_{450nm} 值,以 P/N≥2.1 判定为阳性。

1.2.7 流式细胞检测 用流式细胞仪检测小鼠外周血中 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞的百分比。取小鼠抗凝血(阴性、阳性血)50μl 于流式细胞仪专用上样管中,分别加入 PE-CD8 和 APC-CD4 单抗,避光放置 20min,加 1 500μl 的 NH4Cl 震荡数秒裂解红细胞,15min 后流式细胞仪检测。

1.2.8 IFN-γ、IL-2、IL-12 浓度的测定 采用双抗夹心 ELISA 法检测小鼠血清中 IFN-γ、IL-2、IL-12 的浓度。分别取小鼠的阴性血清、阳性血清,按试剂盒说明书检测 IFN-γ、IL-2、IL-12 的浓度。

1.3 统计学分析

应用 SPSS13.0 软件,对实验数据进行分析,采用 *t* 检验法分析,$P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 *pp65*$_{490\sim508}$-GGGGS-*gB*$_{607\sim621}$ 基因的克隆及重组质粒的双酶切验证

PCR 扩增目的片段经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,在 142bp 处有一条特异性条带,与预期目的条带的大小一致(图 1)。重组质粒经 *Bam*HI 和 *Hind*Ⅲ双酶切,琼脂糖凝胶电泳分析,在 142bp、5 900bp 处有特异性条带,说明目的片段和载体片段大小与预期值是一致的(图 2)。测序结果经 BLAST 比对与理论基因序列一致。

2.2 目的蛋白的表达及纯化

纯化后蛋白进行 12% SDS-PAGE 电泳实验,结果如图 3 所示,纯化后蛋白在 22kDa 附件处有一条明显的条带(目的蛋白理论分子质量为 21.6kDa),经 ImageJ 软件分析电泳条带灰度,测得蛋白质的纯度为 80.1%。采用 BCA 法测定蛋白质浓度,纯化样品蛋白质含量为 30.5mg,纯化后所得样品蛋白含量为 9.3mg,得率为 30.51%。

2.3 Western blot 检测

利用 Western blot 检测抗血清与重组蛋白结合的特异性,结果显示在 22kDa 附近处有特异性条带,在人 HCMV 阳性血清实验中也有特异性条带,而小鼠的阴性血清检测没有条带,说明免疫后的小鼠阳性血清中抗体可以与重组蛋白特异性结合,进一步证明所制备的 HCMV 疫苗可以使小鼠产生体液免疫反应(图 4)。

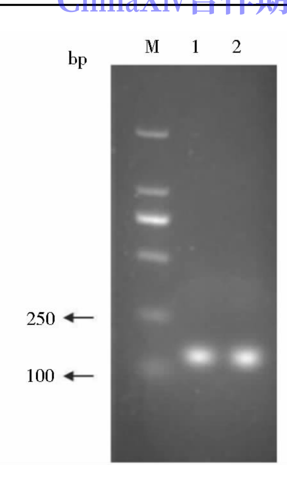


图 1 目的基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR amplification products of fragment

M:DL2 000 DNA Marker; 1, 2: PCR amplification products of pp65 · gB

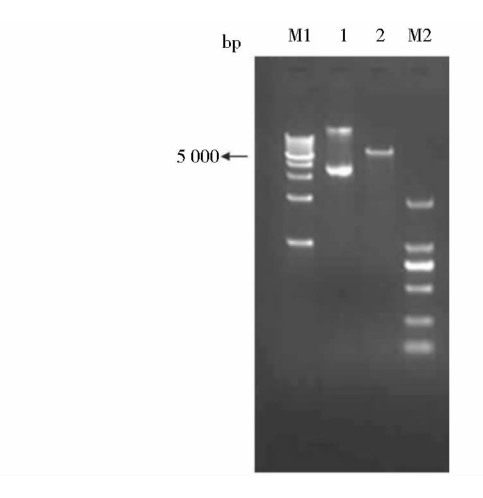


图 2 重组质粒的双酶切验证

Fig. 2 The double restrictive enzyme digestion analysis result of recombination vector

M1: 1kb Ladder DNA Marker; M2: DL2 000 DNA Marker; 1: Recombination vector of pET – pp65 · gB; 2: Recombination vector digested by *Bam*HI and *Hind*Ⅲ

2.4 抗血清效价的测定

间接 ELISA 法测定抗血清的效价,以 P/N≥2.1 的最大稀释度作为被检血清的抗体效价,因此测定抗血清的效价为 1∶102 400(表 1)。

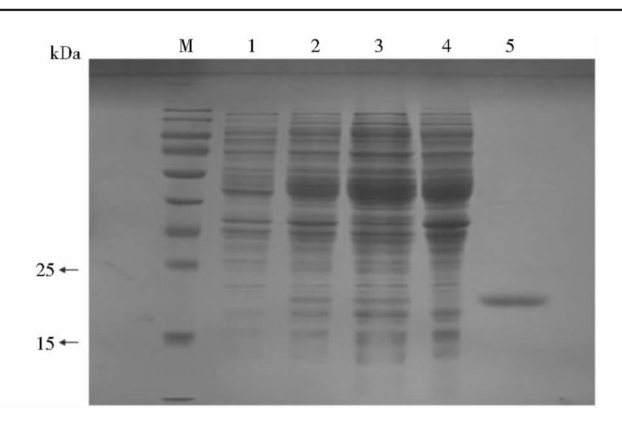


图 3 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant protein

M: Marker; 1: Uninduced bacteria; 2: Induced bacteria; 3: Lysed supernatant; 4: Lysed precipitation; 5: Purified protein

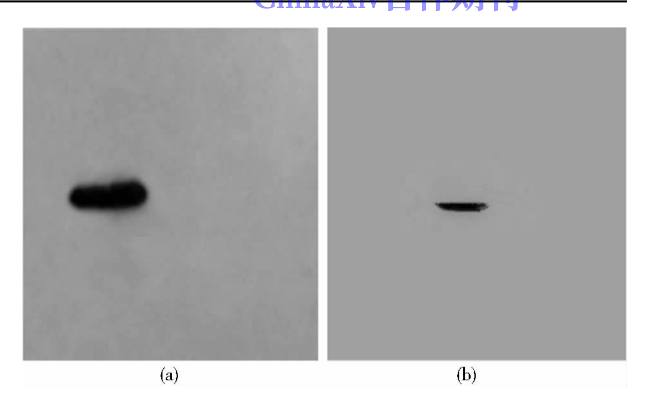


图 4 血清的 Western blot 检测结果

Fig. 4 The result of serum western blot detection

(a) Positive serum of mice (b) HCMV positive serum of human

表 1 小鼠抗体的 ELISA 检测结果

Table 1 ELISA assay result of mice antibody

血清稀释度	1:400	1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400	1:12 800	1:25 600	1:51 200	1:102 400	1:204 800
P	1.310	1.203	1.101	0.946	0.882	0.812	0.754	0.393	0.178	0.077
N	0.125	0.103	0.098	0.081	0.076	0.077	0.062	0.059	0.058	0.052
P/N 值	10.48	11.68	11.23	11.68	11.61	10.55	12.16	6.66	3.07	1.48

2.5 双抗夹心 ELISA 法检测抗原特异性

双抗夹心 ELISA 法结果显示,抗原能与小鼠阳性血清和人 HCMV 阳性血清特异性结合,说明重组蛋白含有 HCMV 抗原表位,具有较好的特异性(表 2)。

表 2 双抗夹心 ELISA 法检测结果

Table 2 Sandwich ELISA assay result

血清稀释度	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400	1:12 800
P	0.391	0.384	0.371	0.372	0.366	0.352	0.329	0.304
N	0.140	0.138	0.127	0.130	0.127	0.994	0.852	0.817
P/N 值	2.80	2.78	2.92	2.87	2.88	0.35	0.39	0.37

2.6 流式细胞仪检测

用流式细胞仪检测小鼠外周血中 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞的百分比。结果显示,与对照组相比,实验组小鼠外周血中 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞的数量有显著增加,差异有统计学意义($P<0.01$),如图 5 所示。

2.7 IFN-γ、IL-2、IL-12 浓度的测定

采用双抗夹心 ELISA 法分别对小鼠血清中 IFN-γ、IL-2、IL-12 浓度进行测定。结果显示,与对照组相比,实验组小鼠血清中 IFN-γ、IL-2、IL-12 的浓度有了显著的提高,差异有统计学意义($P<0.01$),如图 6 所示。

3 讨 论

近 20 年来,随着免疫低下状态人群(爱滋病、放射损伤、器官移植和恶性肿瘤等患者)的增多,HCMV 感染及其引发的严重疾病日益增加,而 HCMV 的药物治疗方法会产生较强的副作用,因此制备 HCMV 疫苗是防治 HCMV 最有效的方法。对于 HCMV 优势抗原表位,即能够产生较强的免疫反应的抗原表位,目前已经研究报道的有 pp65、gB、pp150、IE-1、gH 蛋白等多个抗原表位[18]。而 gB 蛋白和 pp65 蛋白是目前研究最多,也是被证明能分别产生较强的体液免疫和细胞免疫反应的两种蛋白质。

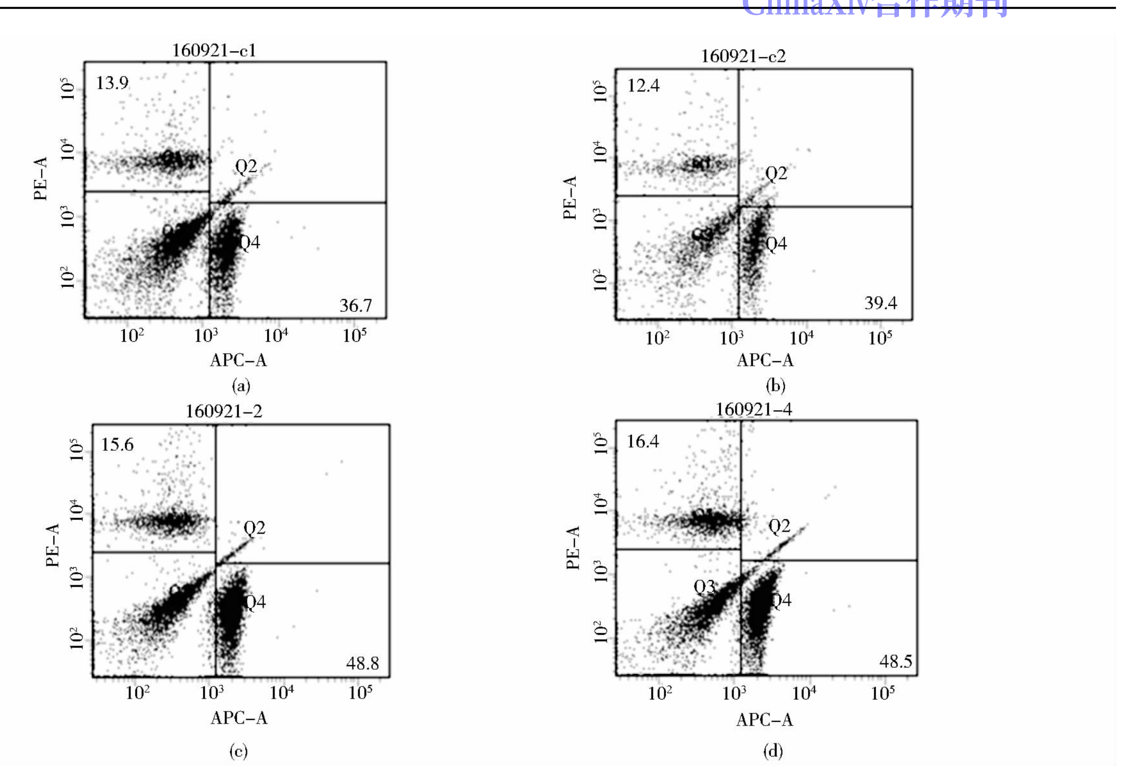


图 5　流式细胞仪检测 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞的百分比

Fig. 5　The percentage of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells detected by flow cytometer

(a), (b) Control group of mice　(c), (d) Experiment group of mice　Q1: Represents CD8⁺ T cells　Q4: Represents CD4⁺ T cells

图 6　ELISA 法测定 IFN-γ、IL-2、IL-12 浓度

Fig. 6　The concentration of IFN-γ、IL-2、IL-12 detected by ELISA

(a) The concentration of IFN-γ　(b) The concentration of IL-2　(c) The concentration of IL-12

通过生物信息学技术,本研究选取 pp65 蛋白的 490 ~ 508aa 和 gB 蛋白的 607 ~ 621aa 作为优势抗原表位,制备 HCMV 疫苗,通过免疫小鼠,检测免疫后血清的指标来探究它的体液免疫和细胞免疫活性,Western blot 和间接 ELISA 方法可以检测小鼠产生的特异性抗体和对应抗原的特异性及抗体的效价。

$CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞作为两种重要的免疫细胞,在机体体液和细胞免疫中发挥重要作用。$CD8^+$ T 细胞能诱导产生 IFN-γ,主要在细胞免疫中发挥重要作用。$CD4^+$ T 细胞可分为 Th1 和 Th2 两大类细胞[19]。Th1 细胞分泌 IFN-γ、IL-2、IL-12 等细胞因子,主要介导细胞免疫应答,并可通过细胞表面的 CD40L 与巨噬细胞表面的 CD40 特异性结合,使巨噬细胞接收信号,进一步清除宿主细胞内的病原体;而 Th2 细胞主要介导体液免疫应答,产生抗体。虽然 $CD8^+$ T 细胞被认为是对抗病毒的主要效应细胞,然而 HCMV 的彻底清除可能高度依赖于数量和功能正常的 $CD4^+$ T 细胞的协助。因此,本研究通过检测小鼠外周血中 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞的数量,以及 Th1 型细胞因子的浓度来探究疫苗在小鼠体内的细胞免疫活性。进一步研究可通过细胞毒性试验、ELISPOT 实验等来探究抗原多肽特异性的 $CD8^+$ CTL 细胞的产生。

综上,本研究通过生物信息学技术选取能产生较强体液免疫和细胞免疫反应的优势序列表位肽段,通过短肽柔链串联,构建人工抗原表位;采用蛋白质工程技术合成 HCMV 人工抗原表位编码基因并与表达载体 pET-32a 连接,通过表达制备重组抗原,利用重组的 His 标签实现金属螯合层析有效分离纯化,作为 HCMV 亚单位疫苗,能诱导小鼠产生较强的 HCMV 体液免疫和细胞免疫反应,对 HCMV 的防治及研制 HCMV 临床应用疫苗具有重要意义。

参考文献

[1] Josef V, Van M H, Sianny C, et al. Use of flow cytometry for characterization of human cytomegalovirus vaccine particles. Vaccine, 2016, 34(20):2321-2328.

[2] Saracino A, Colucci R, Latorraca A, et al. The effects of preemptive therapy using a very low threshold of pp65 antigenemia to prevent cytomegalovirus disease in kidney transplant recipients: a single-center experience. Transplant Proc, 2013, 45(1) : 182-184.

[3] Elisa G, Francesca B, Chiara F, et al. Polyfunctional analysis of human cytomegalovirus (HCMV)-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ memory T-cells in HCMV-seropositive healthy subjects following different stimuli. J Clin Immunol, 2014, 34(8): 999-1008.

[4] Mark R S. Cytomegalovirus vaccines under clinical development. Journal of Virus Eradication, 2016, 2(4): 198-207.

[5] Wang D, Fu T M. Progress on human cytomegalovirus vaccines for prevention of congenital infection and disease. Current Opinion in Virology, 2014, 6(22):13-23.

[6] Mori T, Kato J. Cytomegalovirus infection/disease after hematopoietic stem cell transplantation. International Journal of Hematology, 2010, 91(4): 588-595.

[7] Koch S, Solana R, Dela Rosa O, et al. Human cytomegalovirus infection and T cell immunosenescence: a mini review. Mech Ageing Dev, 2006, 127(6): 538-543.

[8] Stanley P. The history of vaccination against cytomegalovirus. Med Microbiol Immunol, 2015, 204(3):247-254.

[9] Anders E L, Peter W M. The next generation recombinant human cytomegalovirus vaccine candidates-beyond gB. Vaccine, 2012, 30(49): 6980-6990.

[10] Cui X L, Cao Z H, Chen Q Y, et al. Rabbits immunized with Epstein-Barr virus gH/gL or gB recombinant proteins elicit higher serum virus neutralizing activity than gp350. Vaccine, 2016, 34 (34): 4050-4055.

[11] Feire A L, Roy R M, Manley K, et al. The glycoprotein B disintegrin-like domain binds beta 1 integrin to mediate cytomegalovirus entry. Virology, 2010, 84(19):10026-10037.

[12] Moses S, Malathi J, et al. Determination of human cytomegalovirus pp65 antigenemia among renal transplant patients. Indian J Nephrol, 2012, 22(5): 347-352.

[13] 唐光美, 刘菊. 重组人巨细胞病毒疫苗研究进展. 国际生物制品学杂志, 2013, 36(4): 201-206.
Tang G M, Liu J. Progress in research of recombinant human cytomegalovirus vaccines. International Journal of Biologicals, 2013, 36(4): 201-206.

[14] 李小姣, 秦婷婷, 杨春, 等. 含人巨细胞病毒糖蛋白 B 中 AD2 位点 I 的鞭毛融合蛋白在小鼠中的免疫应答. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(5): 451-455.
Li X J, Qin T T, Yang C, et al. Immune responses of flagellin fusion protein containing AD2 site Ⅰ of human cytomegalovirus glycoprotein B in mice. Chin J Biologicals, 2015, 28(5): 451-455.

[15] 邱果, 许凤, 邱义兰, 等. 抗 HCMV pp65 蛋白单克隆抗体的制备及性质研究. 激光生物学报, 2014, 23(4): 338-345.
Qiu G, Xu F, Qiu Y L, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against HCMV pp65 protein. Acta Laser Biology Sinica, 2014, 23(4): 338-345.

[16] 岳盈盈, 宋楠楠, 李志会, 等. 人巨细胞病毒截短被膜磷蛋白 pp65 的原核表达及抗原性分析. 2012, 52(43): 20-22.

Qiu Y Y, Song N N, Li Z H, et al. Prokaryotic expression and antigenic analysis of fragment of tegument protein pp65 of human cytomegalovirus. Shandong Medical Journal, 2012, 52(43): 20-22.

[17] 胡海峰,吴燕. 巨细胞病毒感染的治疗研究进展. 微生物学免疫学进展, 2015, 4(1): 64-68.

Hu H F, Wu Y. Progress on treatment of cytomegalovirus infection. Prog in Microbiol Immunol, 2015, 4(1): 64-68.

[18] Zhao P, Ma D X, Yu S, et al. The development of Chineses specific human cytomegalovirus polyepitope recombinant vaccine. Antiviral Research, 2012, 93(2): 260-269.

[19] Thi H O N, Nicole A M, Lisbeth A S, et al. Refinement in the production and purification of recombinant HCMV IE1-pp65 protein for the generation of epitope-specific T cell immunity. Protein Expression and Purification, 2008, 61(1): 22-30.

Recombinant Expression of Antigen Epitope Genes of Human Cytomegalovirus and Immunogenicity Detection of the Fusion Protein

WANG Meng[1]　SUN Wen-hui[1]　JI Fang-ling[1]　PU Zhong-ji[1]　LI Yin-sheng[2]　BAO Yong-ming[1]

(1 School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian　116024, China)

(2 Dalian Institute for Drug Control, Dalian　116029, China)

Abstract　Objective: To obtain the recomninant protein as HCMV subunit vaccine, the dominant antigen epitope gene of protein pp65 and gB of human cytomegalovirus (HCMV) were expressed in *E. coli*, and the humoral and cellular immune responses of the recombinant protein in Balb/c mice were detected. Methods: The coden genes of 490 - 508 aa in pp65 protein and 607 - 621 aa in gB protein were selected as gene segments and cloned into expression vector pET32a (+) after amplified by PCR. The protein expressed was analyzed by SDS-PAGE, after the recombinant plasmid transformed into *E. coli* BL21 (DE3) plys. Balb/c mice were immunized with the recombinant protein purified by nickel metal chelate affinity column. The humoral immune activity of recombinant proteins was detected by Western blotting and indirect ELISA. The cellular immune activity was detected by flow cytometry and sandwich ELISA. Results: The fusion protein about 22kDa was obtained. Western blotting test showed that the multiclonal antibody for HCMV has specificity and the titers reach to 1∶102 400 detected by indirected ELISA. The number of $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells in peripheral blood and the quantities of IFN-γ, IL-2, IL-12 were significantly higher than control group ($P < 0.01$). Conclusions: The recombinant protein with dominant antigen epitopes can induce significant humoral immunity and cellular immunity in mice, and is a potential vaccine for HCMV.

Key words　Human cytomegalovirus　pp65 protein　gB protein　Humoral immunity　Cellular immunity